

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

679

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **56163447 A**(43) Date of publication of application: **16.12.81**

(51) Int. Cl. **G01N 27/30**
C12Q 1/00
G01N 27/40

(21) Application number: **55068348**(22) Date of filing: **22.05.80**(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**

(72) Inventor: **NANKAI SHIRO**
NAKAMURA KENICHI
IJIMA TAKASHI

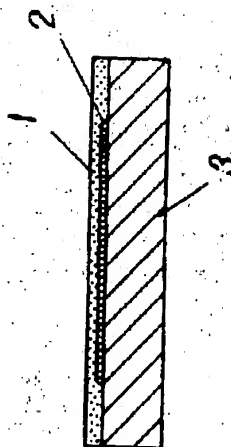
(54) ENZYME ELECTRODE

COPYRIGHT: (C)1981 JPO&Japio

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the enzyme electrode having quick response by providing a platinum layer on a conductive substrate as an electrode for detecting hydrogen and directly fixing enzyme on said electrode.

CONSTITUTION: The pellet shaped conductive substrate 3 is formed by compressing the mixture of 10pts.wt. of fluororesin powder as a binding agent and 90pts.wt. of graphite. Then the platinum layer 2 is provided on the surface of said conductive substrate 3 by the electrolysis of aqueous solution of chloroplatinic acid and the electrode for detecting hydrogen peroxide is obtained. On said electrode, is applied aqueous solution of glucose oxidase. After it has been dried, the device is reacted at 25°C for about one hour in the vapor of alutaric aldehyde, and bridging and fixing are made. Thereafter, the device is well washed, the material not reacted is removed, and an enzyme fixed layer 1 is formed. The enzyme electrode obtained in this way indicates quick response, and its characteristics will not change for a long time even though it is repeatedly measured and washed.



⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭56-163447

⑫ Int. Cl.³

G 01 N 27/30

C 12 Q 1/00

G 01 N 27/40

識別記号

庁内整理番号

7363-2G

7349-4B

7363-2G

⑬ 公開 昭和56年(1981)12月16日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ 酵素電極

⑮ 特 願 昭55-68348

⑯ 出 願 昭55(1980)5月22日

⑰ 発 明 者 南海史朗

門真市大字門真1006番地松下電
器産業株式会社内

⑱ 発 明 者 中村研一

⑲ 発 明 者 飯島孝志

門真市大字門真1006番地松下電
器産業株式会社内

門真市大字門真1006番地松下電
器産業株式会社内

⑳ 出 願 人 松下電器産業株式会社

門真市大字門真1006番地

㉑ 代 理 人 弁理士 中尾敏男 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

酵素電極

2. 特許請求の範囲

(1) 導電性基体上に白金層を設けてなる過酸化水素検知用の電極と、この電極上に直接固定化してなる酸化還元酵素層とを備えたことを特徴とする酵素電極。

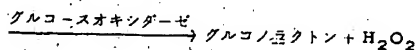
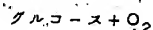
(2) 導電性基体が、カーボンを主成分とする加圧成型体あるいは導電性被膜形成体からなる特許請求の範囲第1項記載の酵素電極。

3. 発明の詳細な説明

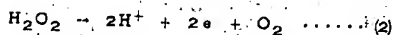
本発明は、酵素の特異的触媒作用を利用し、基質濃度を迅速かつ簡便に測定することができ、しかも連続使用、繰り返し使用の可能な高選択性の酵素電極を得ることを目的とする。

近年、酵素固定化技術の進歩に伴い、酵素反応と電気化学反応を組み合わせることに伴い、酵素と特異的に反応する物質である基質の濃度を検出することが各種試みられている。その一例として、

酵素反応で生成した過酸化水素 (H_2O_2) を電気化学的に検知する方法がある。すなわち以下の(1)、(2)式に例を示す様に、まず酵素を水素受容体とする酸化還元酵素 (例えばグルコースオキシダーゼ) の作用により基質 (グルコース) が酸化されて H_2O_2 が生成する。次に、この生成した H_2O_2 を白金電極などを用いて酸化し、この時得られる酸化電流値から基質 (グルコース) の濃度を知ることができる。



..... (1)



しかしながら酵素は水溶性であるので、高価な酵素の繰り返し使用を可能ならしめるためには、適当な方法により酵素を過酸化水素検知用電極の近傍に固定化 (不溶化) する必要がある。従来、過酸化水素検知方式の酵素電極の構成としては、検知用電極として白金板を用い、この電極近傍

に酵素を固定化した膜を配設している。このよう³な膜を用いることにより酵素の固定化は容易となるが、被検液中の基質は膜中の拡散することになり、これに基づく応答の遅れが生ずる。この様な応答の遅れは、特に多数の被検物を連続的に分析する際に問題となる。基質濃度変化に対し迅速な応答を示す酵素電極を得るためには、白金板上に酵素を直接固定化する方法が考えられる。しかし、白金板上への酵素の固定化が困難であることや、高価な白金板の再使用などに課題が残る。

本発明者は、上記諸点について種々検討した結果、優れた特性を有する酵素電極を見出した。本発明による酵素電極の一構成例の断面模式図を第1図に示す。図中、1はグルコースオキシダーゼなどの酸化還元酵素を固定化してなる層、2は過酸化水素検知用の白金層、3は例えばグラファイト等のカーボンを主体とする加圧成型体からなる導電性基体である。

本発明の特徴は、導電性基体上に白金層を設けて過酸化水素検知用の電極を構成し、この電極上

に酵素を固定化した膜を配設することにより、応答特性に優れ、かつ連続使用、繰り返し使用の可能な酵素電極を得ることができる。

以下、本発明の一実施例について説明する。
まず、グラファイト90重量部に結着剤としてフッ素樹脂粉末10重量部を混合したものを加圧成型してペレット状の導電性基体を構成し、次に塩化白金酸水溶液から電解法で前記基体表面に白金層を設けて過酸化水素検知用電極とした。この電極上にグルコースオキシダーゼ水溶液を塗布し、少し乾燥した後、グルタルアルデヒド蒸気中にて25℃で約1時間反応させて架橋固定化し、この後、十分水洗して未反応物を除去した。こうして得られた本発明の酵素電極をAとする。

比較のための従来の酵素電極として次のものを作製した。酵素固定化用担体膜として、ポリカーボネート多孔膜(膜厚8μm、孔径10μm、孔密度 1×10^5 個/cm²)を用い、この膜にグルコースオキシダーゼ水溶液を塗布し、少し乾燥させた後、前記と同様にして架橋固定化した。得られた

特開昭56-163447(2)

に酵素を直接固定化した点にある。すなわち、本発明の酵素電極においては、必要最小限の白金層を設けることにより過酸化水素を検知し、かつ導電性基体は白金層に対する電気的接触を得るとともに、酵素固定化用担体をも兼ねるものである。この様に構成することにより、酵素の密着固定化は容易となり、膜を用いないため迅速な応答が得られる。

導電性基体としては、電気化学的に安定な性質を有することが条件であり、前述のカーボンなどを主体とする加圧成型体などの他に、例えばネサガラスなどの導電性被膜形成体でも良い。これら導電性基体上への白金層の形成は、下地の性質に合わせて、蒸着法、熱分解法、アルデヒドなどを用いる化学還元法、あるいは電解法などの方法で行なうことができる。必要な白金量としては、例えば電解法の場合、導電性基体に対し200~400ミリグラム/cm²(厚さ1μm以下)相当量の電解で十分であり、コストの点からも有利である。この様な白金の薄層を設けた基体上に酵素を直接固

定した膜を白金板からなる過酸化水素検知用電極に密着固定し、酵素電極とした。この電極をBとする。

上記で得られたA、Bの酵素電極を用いて、第2図に示す測定系により、グルコースの濃度変化に対する応答特性を測定した。第2図において、4は記録計、5はポテンシオスタット、6は飽和カロメル参照電極、7は下端部に酵素電極を装着した樹脂製の電極ホルダーであり、リードを介してポテンシオスタットに接続されている。8は基質を含むリン酸緩衝液、9は塩橋、10は対極である。

酵素電極を液中に浸漬し、H₂O₂を酸化するに十分な電位に設定した後、攪拌しながらグルコースを添加して所定の濃度とし、このときの電流変化を測定した。

グルコースを添加し、濃度を 1×10^{-4} モル/lとしたときのA、B各酵素電極の応答の経時変化を第3図に示す。本発明の酵素電極Aは電流の増加量も大きく、しかも5秒程度で定常値に達する

第4図はグルコース濃度に対する応答特性を示す図である。

1 酵素固定化層、2 白金層、3 導電性基体。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

など迅速な応答を示しており、優れた特性を有することがわかる。さらに、第4図に示すごとく、グルコース濃度変化に対しても、直線性を失うことなく大きな応答が得られるなど、その応答特性の向上は著しい。また、本発明の酵素電極は、測定洗浄の繰り返し使用に対しても長期間その応答特性を維持するなど優れたものであった。

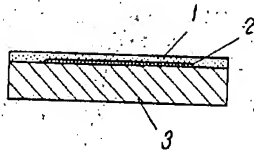
適用可能な酵素としては、グルコースオキシダーゼの他に、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼなど酵素反応で H_2O_2 を生成する酸化還元酵素であれば良い。さらにはこれらの酵素を含む複合酵素系にも適用できる。

以上述べたごとく、本発明の酵素電極は応答の迅速性、感度に優れ、繰り返し使用が可能であるなど、その工業的価値は大である。

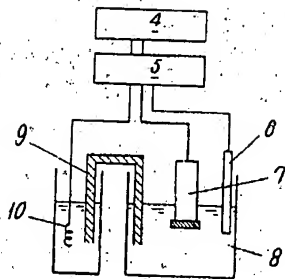
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の酵素電極の一構成例を示す断面模式図、第2図は測定系を示す図、第3図はグルコース添加に対する応答の経時変化を示す図、

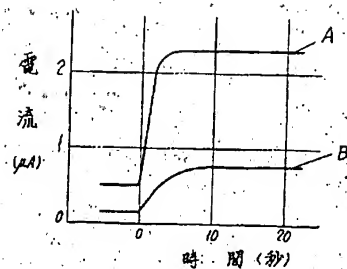
第 1 図



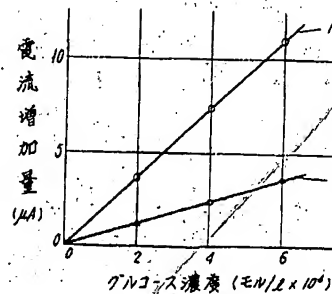
第 2 図



第 3 図



第 4 図



昭 59 3. 27 発行

手続補正書

昭和 59 年 1 月 26 日

特許庁長官様

1 事件の表示

昭和 56 年 特 許 願 第 68348 号

2 発明の名称

解 密 電 機

3 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人
住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
名 称 (582) 松下電器産業株式会社
代 表 者 山 下 俊 彦

4 代 理 人 〒 571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内

氏 名 (5971) 代理人 中 尾 敏 男

(印) (5971) 代理人 中 尾 敏 男

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

明細書第3頁第3行の「腹中」を「腹中を」
と訂正します。

59.1

76.2

14. 21

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 55 年特許願第 68348 号(特開昭
56-163447 号 昭和 56 年 12 月 16 日
発行 公開特許公報 56-1635 号掲載)につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があ
ったので下記のとおり掲載する。 6 (1)

Int. Cl.	識別記号	序内整理番号
G01N 27/30		7363-2C
G12Q 1/00		8213-4B
G01N 27/40		2363-2G